

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-529550

(P2002-529550A)

(43) 公表日 平成14年9月10日 (2002.9.10)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 0 8 B 37/08		C 0 8 B 37/08	Z 4 C 0 8 1
A 6 1 K 31/728		A 6 1 K 31/728	4 C 0 8 6
A 6 1 L 27/00		A 6 1 L 27/00	D 4 C 0 9 0
			P
			V
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 22 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2000-581064 (P2000-581064)	(71) 出願人	アクイジティオ ソチエタ ベル アツィオニ
(86) (22) 出願日	平成11年11月8日 (1999.11.8)		イタリア国, イ-20144 ミラノ, ピアッ
(85) 翻訳文提出日	平成13年5月10日 (2001.5.10)		ツァーレ アクイレイア 8
(86) 国際出願番号	P C T / E P 9 9 / 0 8 4 8 1	(72) 発明者	バルブッチ, ローランド
(87) 国際公開番号	W O 0 0 / 2 7 8 8 7		イタリア国, イ-20144 ミラノ, ピアッ
(87) 国際公開日	平成12年5月18日 (2000.5.18)		ツァーレ アクイレイア 8, アクイジテ
(31) 優先権主張番号	M I 9 8 A 0 0 2 4 4 0		ィオ ソチエタ ベル アツィオニ
(32) 優先日	平成10年11月11日 (1998.11.11)	(72) 発明者	ラブオーリ, ロベルト
(33) 優先権主張国	イタリア (I T)		イタリア国, イ-20144 ミラノ, ピアッ
			ツァーレ アクイレイア 8, アクイジテ
			ィオ ソチエタ ベル アツィオニ
		(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外4名)
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 架橋ヒアルロン酸及びその医療上の使用

## (57) 【要約】

本発明は、抽出された又は生合成された天然の直鎖状ヒアルロン酸の活性化されたカルボキシル基と、ポリアミン、特に直鎖状アルキルジアミンとの反応により得られる新規な架橋されたヒアルロン酸に関する。本発明の架橋ヒアルロン酸は、場合により硫酸化又はヘミスクシニル化され、そして滑液、硝子液の代用品として、薬物の放出制御用マトリックスとして、治癒剤及び接着防止剤として、更に人工血管、バイオハイブリッド臓器、治癒用品、眼用及び耳用組成物、プロテアーゼ、インプラント及び医療用品の調製のために有用である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒアルロン酸のカルボキシル基とポリアミンとの反応により得られる架橋されたヒアルロン酸。

【請求項2】 前記ポリアミンがジアミンである、請求項1に記載の架橋ヒアルロン酸。

【請求項3】 前記ジアミンが式  $R_1NH-A-NHR_2$  を有する、請求項2に記載の架橋ヒアルロン酸：

ただし前記式中、Aは、場合によりヒドロキシ、カルボキシ、ハロゲン、アルコキシ及びアミノ基により置換された直鎖状又は分枝状  $C_n-C_m$ 、アルキレン鎖、好ましくは  $C_n-C_m$  鎖；ポリオキシアルキレン鎖  $[(CH_2)_n-O-(CH_2)_m]$ 、ただしnは2又は3であり、mは2～10の整数である；アリール、又はヘタリール基、好ましくは1,4又は1,3-二置換ベンゼンであり、そして  $R_1$  及び  $R_2$  は、同一であっても異なってもよく、水素、 $C_n-C_m$ 、アルキル、フェニル又はベンジル基である。

【請求項4】 Aが、直鎖状  $C_n-C_m$ 、アルキレン、又は式  $[(CH_2)_n-O-(CH_2)_m]$  を有し、nが2であり、そしてmが2～10の整数である鎖である、請求項3に記載の架橋ヒアルロン酸。

【請求項5】 ヒドロキシ基が硫酸化又はヘミスクシニル化されている、請求項1～4のいずれかに記載の架橋ヒアルロン酸。

【請求項6】 ゲルの形状である、請求項1～5のいずれかに記載の架橋ヒアルロン酸。

【請求項7】 固形又は半固形である、請求項1～6のいずれかに記載の架橋ヒアルロン酸。

【請求項8】 請求項1～7のいずれかにおける、亜鉛、銅又は鉄の錯体。

【請求項9】 滑液、硝子液の代用品として、放出制御薬剤マトリックスとして、治癒剤及び接着防止剤としての、請求項6又は8に記載の架橋ヒアルロン酸誘導体の使用。

【請求項10】 人工血管、バイオハイブリッド臓器、治癒用品、眼及び耳用組成物、プロテアーゼ、インプラント及び医療用品の調製のための、請求項7に

記載の架橋ヒアルロン酸誘導体の使用。

【請求項 1 1】 請求項 1 ～ 8 に記載の架橋ヒアルロン酸を含んで成る、生体材料。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

発明の分野

本発明は、場合によりヘミスクシニル化又は硫酸化された、架橋されたヒアルロン酸、これの生物学的に適当な又は薬理学的に活性なカチオンとの塩及び重金属、例えば銅、亜鉛及び鉄との錯体に関する。

本発明はまた、医療、医薬及び化粧の分野における前記架橋ヒアルロン酸、その塩及び錯体の使用にも関する。

## 【0002】

発明の背景

ヒアルロン酸は、D-グルクロン酸とN-アセチルグルコサミノ-2-アセタミド-2-デオキシ-D-グルコースとが $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) グリコシド結合により連結された二糖単位から成るグルコサミノグリカンである。

天然のヒアルロン酸は、直鎖状で、架橋されていない構造であり、そして起源及び抽出方法に応じて50000~800000Da又はそれ以上の分子量を有する。

ヒアルロン酸は、高等動物の滑液、結合組織及び硝子液中に、並びにいくつかの細菌中に存在する。

## 【0003】

種々の分子量のヒアルロン酸ナトリウムを含む組成物（種々の粘性を有する溶液、種々の粘弾性を有するゲル、スポンジ、フィルム又は膜の形で）が、人間の内科及び外科分野において、例えば滑液代用品、組織接着防止剤、硝子液代用品、人工涙、インビボでの組織再構築剤（例えば骨芽細胞の集落形成と次の石灰化の後の骨部分の形成、そして線維芽細胞の集落形成後の結合皮膚組織の形成のための細胞外マトリックスとして）、火傷治療又は形成外科において有用な人工皮膚の調製のための材料、生体適合性を有する人工血管のためのコーティング剤、放出制御製剤中の医薬活性成分のための担体などとして、用いられている。

## 【0004】

皮膚科学及び美容術の分野では、粘弾性及び保湿性、並びに高い生体適合性の

観点から、前記組成物は、保湿性局所剤のベースとして、及び侵襲性の医療手術用品（デバイス）（「充填剤」）として用いられる。

しかし前記の使用目的における天然の直鎖状ヒアルロン酸の使用は、酵素系、例えばヒアルロニダーゼ、グルコシダーゼ及びグルクロニダーゼによるインビボでの速い分解、それに続く分子量の低下及び粘弾性の継続的な損失、そして一般的には、最終組成物及び用品（デバイス）の物理的特性（機械的強度、弾性、孔サイズ）の損失などにより制限される。

#### 【0005】

この問題を克服するために、更に主には組成物の範囲及びその適用柔軟性を高めることを目的として、化学的に修飾されたヒアルロン酸が提唱されている。

多官能価エポキシド（US 4716224, 4772419, 4716154）、ポリアルコール（US 4957744）、ジビニルスルホン（US 4582865, 4605601, 4636524）、アルデヒド（US 4713448, 5128326, 4582568）、ビスカルボジイミド（US 5356883）、ポリカルボン酸（EP-A-718312）による架橋が開示されている。

#### 【0006】

前記の架橋ヒアルロン酸は、インプラント、プロテアーゼ及び医療用品（デバイス）のための生体材料として、薬剤のための放出制御マトリックスとして、治療用、接着防止用及び包帯用の剤として用いられる。

非架橋ヒアルロン酸の硫酸化が一般的にはUS 5013724に開示されており、これは、抗血栓剤及び抗凝固剤として使用するためのヘパリン、ヘパラン及びデルマトンの硫酸化に主に関する。

ヒアルロン酸（HY）のヘミスクシニル化再形成はこれまで開示されていない。この官能化の例はEP-B-200574に開示されており、これは、スクシニル化されたコラーゲン及びキトサンから成る複合生体材料に関する。

#### 【0007】

加熱による、架橋剤としてのHYを有する吸着性物質の調製における、ジ又はポリアミンによるカルボキシアルキルセルロースの架橋がEP-A-56611

8 (Kimberly Clark Corp) に開示されている。前記方法は、明らかに経済的に有利であり、そしてこの種の産物のために要求される大規模生産に適する。

E P - A - 4 6 2 4 2 6 (Fidia) は、穿孔された生体適合膜及びその人工皮膚としての使用を開示している。一般的には、ジアミンにより架橋されたコラーゲン及びヒアルロン酸が、前記の膜の可能な材料として引用されている。

【0008】

#### 発明の要点

ヒアルロン酸 (HY) の適当に活性化されたカルボキシル基とポリアミンとの反応により得られる新規な架橋されたヒアルロン酸、その適当な有機又は無機カチオンとの塩及び錯体が、生体医療及び化粧における使用にとって有益な化学物理的及び生物学的特性を有することが現在分かっている。

【0009】

本発明の化合物の主な化学物理的及び生化学的特徴は、以下の通りである：

- ・高い生体適合性；
- ・主に硫酸化の後での、酵素分解に対する高い抵抗性；
- ・架橋度、並びに硫酸化及び／又はヘミスクシニル化の程度に依存する、高い吸水容量及び粘弾性の形成；
- ・金属イオン、例えば亜鉛又は銅イオンをキレートする能力、この誘導体は非常に良い安定性を有する。

【0010】

この生物学的特性は新しく、そして驚くべきものである。すなわち、グリコサミノグリカン、例えばヘパリン、デルマタン硫酸、コンドロイチン及び天然ヒアルロン酸の硫酸化（又はスーパー硫酸化）は、その出発産物に比べて抗凝固特性（Xa及びIIa因子の阻害、及び／又はそれらの比の変化）を増加させることが知られている。

【0011】

本発明の化合物は、硫酸化された場合、わずかな抗凝固活性を有する。一方、本発明の架橋ヒアルロン酸（種々の架橋度を有する）及びそれらの対応する硫酸エステルの方における、血小板の活性化及び凝集（行動上のストレスを与えた

ウサギを用いたPRPモデルにより、抗接着活性として測定した；“Abstract 1 L15” -International conference on Advances in Biomaterials and Tissue Engineering, 14-19 June 1998, Capri Italy に記載されている）の欠失は全く驚くべきことである。この特性は、天然のヒアルロン酸及びエステル誘導体には全く無い。

今までの医療使用目的のいずれのポリマー材料も、明らかに前記特性を有さない。

【0012】

#### 発明の詳細な説明

本発明は、抽出された又は生合成された天然の直鎖状ヒアルロン酸の活性化されたカルボキシル基の、ポリマー、特に直鎖状アルキルジアミンとの反応により得られる新規な架橋ヒアルロン酸に関する。

【0013】

好ましい態様では、本発明の架橋ヒアルロン酸に対して、更に硫酸化及びヘミスクシニル化を行う。得られた産物、及びその塩又は錯体は全く新規な特性（例えば、膨潤性、当該ゲル内の水運動性；内皮細胞上の走化性、粘弾特性）を有する。

【0014】

前記のエステル化を、既知の方法（pH 6.5～8で、均質相又は不均質相で、試薬ピリジン／SO<sub>2</sub>；クロロスルホン酸；無水コハク酸を使用する）により行う。

コラーゲンにおけるヘミスクシニル化の例がWO 88/10123及びUS 4493829に報告されている。

【0015】

本発明において架橋剤として用いるポリアミンは、好ましくは式 R<sub>1</sub> NH-A-NH R<sub>2</sub> のジアミンである。ただし前記式中、Aは、場合によりヒドロキシ、カルボキシ、ハロゲン、アルコキシ及びアミノ基により置換された直鎖状又は枝状 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキレン鎖、好ましくは C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>鎖；ポリオキシアルキレン鎖 [ (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - O - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> ]、ただし n は 2 又は 3 であり、m は 2 ～ 1



0の整数である； $C_1-C_4$ 、シクロアルキル基；アリール、又はヘタリール基、好ましくは1, 4-又は1, 3-二置換ベンゼンであり；

$R_1$ 、及び $R_2$ は、同一でも異なってもよく、水素、 $C_1-C_4$ アルキル、フェニル又はベンジル基である。

【0016】

好ましくはAは $C_1-C_4$ アルキレン又は鎖 $[(CH_2)_n-O-(CH_2)_m]$ である。 $R_1$ 、及び $R_2$ は好ましくは水素である。

このポリアミンが、予めカルボキシル基が活性化されたヒアルロン酸又はその塩と反応する。

【0017】

前記の活性化を通常の方法で行い得る。例えば、そして好ましくは、無水非プロトン性溶媒中で、ペプチド合成においてアミド結合を形成させるために普通に用いられるもの、例えばカルボニルジイミダゾール；カルボニルトリアゾール；ヒドロキシベンゾトリアゾール；N-ヒドロキシスクシンイミド；p-ニトロフェノール+p-ニトロフェニルトリフルオロアセテート；ヨウ化クロロメチルピリジリウム、好ましくはヨウ化クロロメチルピリジリウム、などを用いる。これらの活性化剤により、最高の収率、及び架橋度の点で最高の再現性が可能となる。

【0018】

好ましくは、当ヒアルロン酸は、親脂性カチオン、例えばテトラアルキルアンモニウム又はその他の親脂性有機塩基により塩化され、極性非プロトン性溶媒、例えばジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン又は類似物中での適当な溶解性を得ることができる。

【0019】

無機塩の変換、例えばナトリウムから適当な有機カチオンへの変換を、均質相中での周知のイオン交換法により、あるいは酸成分の沈殿、その回収、そして希望の有機塩基による塩化により行い得る。

カルボキシル基の活性化は、通常、均質相中で、そして無水極性非プロトン性溶媒中で行なわれる。

## 【 0 0 2 0 】

架橋性ポリアミンを、前記と同一の無水溶媒中の活性化されたエステルの溶液に加え、0～30℃の温度に保つ。反応時間は、適当な塩基、例えば、トリエチルアミンの存在に依存して、1～12時間の範囲である。

一般的には、希望の最終産物を、減圧下での異なる溶媒の添加、その後の通常の仕上げにより回収する。

## 【 0 0 2 1 】

その架橋度は、広範囲内にすることができ、カルボキシ活性化剤の量を変えることによって調整することができる。なぜなら前記の活性化及び架橋反応は実際上定量的であるからである。

結果として、希望する架橋度（C. L. D. : 架橋に関与するカルボキシル基の％）は、NMRデータにより示される通り、完全に再現可能である。従って同様の操作条件下で得られる最終産物は一定の特性を有する。

## 【 0 0 2 2 】

出発材料となるヒアルロン酸は、約5000～800000Da、好ましくは10000～200000Daの分子量を有する任意のものでよく、そして通常の起源から抽出されるか、又はストレプトコッカス菌群の微生物若しくはその他の工学修飾された菌株の発酵により得られる。

本発明の架橋ヒアルロン酸に対して、適当な試薬により、好ましくはジメチルホルムアミド中でピリジン／三酸化イオウ錯体により硫酸化反応を行い得る。

## 【 0 0 2 3 】

この反応を、不均質相中で0～10℃の温度で約0.5～約6時間の反応時間で行う。

達成し得る硫酸化の程度は広範囲であり、反応時間と温度を変えることによって調整可能である。

一般的には、硫酸化の程度（硫酸基当量／gと定義される）は $1 \times 10^{-6}$ ～ $6 \times 10^{-6}$ であり、C. L. D = 0.5の場合、好ましくは約 $2 \times 10^{-6}$ 当量／gである。

## 【 0 0 2 4 】

また本発明の架橋ヒアルロン酸に対して、既知の条件（水性不均質相中で強く攪拌しながら、固形無水コハク酸を、重量比1：1～1：5の割合で少しずつ加え；5～30℃の温度でそのpHをアルカリで7～8.5に維持する）でヘミスクシニル化反応を行ってもよい。このヘミスクシニル化の程度は、以下のパラメーター：反応時間と温度；当該多相系の攪拌速度、及び固形無水コハク酸の添加速度、に応じて、広範囲になり得る。前記パラメーターを一定に保つことにより、この反応において再現性ある産物が得られる。本発明の、場合により硫酸化又はヘミスクシニル化された架橋ヒアルロン酸は、金属イオン、例えば銅、亜鉛、鉄と錯体を形成する能力を示す。

#### 【 0 0 2 5 】

この様な錯体を以下の通りにして容易に得ることができ、すなわち、水中でヒアルロン酸誘導体が完全に膨潤するまで溶解又は分散し、そして攪拌しながら、好ましくは室温で銅、亜鉛又は鉄の有機又は無機塩、例えば $\text{CuCl}_2$ 、 $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ の濃溶液を加え、12～24時間攪拌した後、遠心により、又は溶媒変化（例えばエタノール又はアセトンの添加）後の沈殿により、又は減圧下での蒸発により錯体を回収し、この回収された粗産物を、過剰なイオンを取り除くために、蒸留水で完全に洗浄することにより得ることができる。

#### 【 0 0 2 6 】

次に、この錯体を凍結乾燥する。金属イオンの含量は、用いた操作条件：ポリマー対イオンのモル比、溶液の濃度及びpH、反応時間、及び特に架橋度に応じて変動する。前記含量は、最大で、架橋に関与しない二糖単位あたり一金属イオンに達し得る。

#### 【 0 0 2 7 】

本発明の重要な利点は、架橋度及び／又は硫酸化若しくはスクシニル化の程度を適当に変えることにより、種々の特性（例えば粘弾性、金属イオン、ヒドロゲル、フィルム、スポンジ形成能、機械的強度など）により特徴づけられる広範囲の異なる形のヒアルロン酸誘導体を生産できる可能性にある。

#### 【 0 0 2 8 】

従って、いくつかの医療及び医薬分野で、人間及び動物に関する分野で、以下

の通りに本発明のヒアルロン酸誘導体の使用が可能となる。

- 1) 変形性関節症の治療のための関節内の滑液代用品として。
- 2) 眼手術に関連する病症状及び副作用の治療のための硝子液代用品として。
- 3) 乾燥眼の治療に適する人工涙調合液のベースとして。

【 0 0 2 9 】

4) 本発明の化合物から得られたヒドロゲル中への単純な包含による、薬物（例えば抗炎症薬、抗生剤、 $\beta$ アドレナリン性アゴニスト及びアンタゴニスト、アルドースレダクターゼ阻害剤、抗アクネ薬、抗アレルギー薬、脱毛防止薬、抗腫瘍薬、緑内障治療薬、かゆみ止め、疥癬治療薬、抗脂漏薬、潰瘍治療薬、抗ウイルス薬、成長因子など）の放出制御用マトリックスとして。

【 0 0 3 0 】

包含する代りに、以下の方法で薬物をヒアルロン酸マトリックスに共有結合してもよい：

a) 薬物がアルコール又はアミンである場合、ポリアミンとの架橋に関与しないCOOHのエステル化又はアミド化；

b) 薬物が遊離カルボキシ基を有する場合、ヒアルロン酸誘導体の遊離ヒドロキシ基とのエステル化。

a) の産物を、注意深く無水である溶媒中での前記と同一のカルボキシ基活性化方法により、又はトランスエステル化により得ることもできる。

【 0 0 3 1 】

5) 傷又は皮膚潰瘍の治療のための、幾分ガスを透過させる異なる厚さのフィルム、スポンジなどの形の用品（デバイス）の調製のために。この調製品は、好ましくは適当な薬物、例えば抗生剤、治療因子を含む。これらは上皮細胞、ケラチノサイトなどの培養においても有用である。

【 0 0 3 2 】

6) 既知のヒアルロン酸の使用が既に提案されている全ての適用のために。例えば、人工血管（血管、人工心臓弁などの接着防止包帯剤）；バイオハイブリッド臓器（人工脾臓、肝臓）；眼用製品（レンズ代用品、コンタクトレンズ）；耳用製品；腹部外科、婦人科、成形外科、整形外科、神経科、眼科、胸部外科、耳鼻

咽喉科の手術に用いられる抗接着性インプラント；医療用品（デバイス）、例えばステント、カテーテル、カニューレ及び類似品、の製造のための固形品又は半固形品又は成形可能な形の品の調製のために。

【 0 0 3 3 】

架橋ヒアルロン酸、及びそれから得られる生体材料の使用が知られており、例えば WO 97/39788, WO 97/22629, WO 97/18244, WO 97/7833, EP 763754, EP 718312, WO 96/40005, WO 96/33751, US 5532221, WO 95/1165, EP 320164 に記載されている。

皮膚美容術における本発明の架橋ヒアルロン酸の使用は特に注目されており、例えば保湿剤、種々の美容用品のベース、注入可能な充填剤などとして使用される。

【 0 0 3 4 】

本発明の架橋ヒアルロン酸誘導体から得られる成形品を、技術上の特性の変化を起こすことなく、滅菌することができる（例えば 120℃ への加熱、又はエチレンオキサイドによる）。このことは、当然に、本発明により提供される別の利点である。

本発明を、以下の実施例においてより詳細に説明する。

【 0 0 3 5 】

実施例 1

下記の方法のいずれかにより、ヒアルロン酸のナトリウム塩（二糖単位を基準にして  $1 \times 10^{-3}$  モル）を TBA 塩に変換した。

a) ヒアルロン酸ナトリウムの 1% 水溶液を、H<sup>+</sup> 形強カチオン性樹脂（Amberlite IR 120）により H<sup>+</sup> 形に変換する。その最終溶液を TBA-OH の 0.5% 溶液により処理して、pH 約 9 にする。

b) ヒアルロン酸ナトリウムの 1% 水溶液を、TBA' 形の弱カチオン性樹脂（Amberlite IRC 50）で処理することにより、TBA 塩溶液に変換する。

【 0 0 3 6 】

いずれの場合も、最終溶液を凍結乾燥する。次にこのTBA塩を、窒素ガス下で0℃で、15mlの無水DMF中に溶解し、そのTBA塩の保存溶液に、2mlの無水DMF中の0.02gのヨウ化クロロメチルピリジリウム(CMPJ)を一滴ずつ加える。

次に、この反応混合液に、0.1mlのトリエチルアミンを加え、更に2mlの無水DMF中の1,3-ジアミノプロパン溶液( $d = 0.88$ 、活性化されたカルボキシル基の架橋をより容易にするために過剰量用いる)を一滴ずつ加えた。添加終了後、この反応混合液を少くとも30分間攪拌し、それから減圧下でその溶媒を除き、その残査をDMFにより回収し、そのDMFを蒸留により除き、次にその残査を、エタノール、エタノール水、そして最後に水によって処理した。

【0037】

この産物を凍結乾燥し、そしてその残査を分析した。

I. R. (フィルム) :  $1630\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CO}-\text{NH}$ ) ;  $1740\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{COOH}$ 、多糖) ;  $3200\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{NH}-$ )。

SD (膨潤度、室温で水中に15秒放置した後、重量測定する。  $SD = ((W_s - W_d) / W_d) \times 100$ 、ただし  $W_s$  = 水和したゲルの重量、 $W_d$  = 乾燥ゲルの重量) : 31000。

架橋度 : 0.05 (最初に利用可能であるカルボキシル基の5%)

【0038】

#### 実施例 2

実施例1に記載した手順及び条件に従って、同一のヒアルロン酸(HY)及び同一の活性化剤を用いて、しかし1,3-ジアミノプロパンの代りに1,6-ジアミノヘキサンを用いて、架橋度が0.05である架橋ヒアルロン酸を得た。

I. R. (フィルム) :  $1630\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CO}-\text{NH}$ ) ;  $1740\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{COOH}$ 、多糖) ;  $3200\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{NH}-$ )。

【0039】

#### 実施例 3

実施例1に記載の手順及び条件に従って、架橋剤0,0'-ビス-(2-アミノプロピル)PEG500を用いて、架橋度が0.05である架橋ヒアルロン酸

を得た。

I. R. (フィルム) :  $1630\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CO}-\text{NH}$ ) ;  $1740\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CO}$   
OH 多糖) ;  $3200\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{NH}-$ )。

SD : 31000。

[0040]

#### 実施例 4

0.6 g のヒアルロン酸トリブチルアンモニウム塩 (二糖単位を基準にして  $1 \times 10^{-3}$  モル) を、窒素ガス下で攪拌しながら、30 ml の DMF 中に溶解した。2 ml の DMF 中に溶解した 0.08 g のヨウ化クロロメチルピリジリウム ( $3.5 \times 10^{-4}$  モル) を、0℃に維持した前記溶液に一滴ずつ加えた。従ってこのモル比は約 3 : 1 であった。

[0041]

20 分後に、2 ml の 1, 3-ジアミノプロパン (0.024 モル) を加え、その直後に 0.5 ml のトリエチルアミンを加えた。固体のゼラチン状の産物が得られた。次にこの産物を水で膨潤させ、そして再度エタノールで洗浄した。

この最終産物は、凍結乾燥後に、走査顕微鏡観察から、滑らかな領域とスポンジ状の領域とが交互に存在する不規則なパターンを有することが示された。

架橋度は 0.3 (最初に利用可能であったカルボキシル基の 30%) であった。

I. R. (フィルム) :  $1740\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{COOH}$ ) ;  $1630\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CO}-\text{NH}$ ) ;  $1610\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{COO}-$ ) ;  $1560\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CO}-\text{NH}-$ )。

[0042]

#### 実施例 5

0.6 g のヒアルロン酸トリブチルアンモニウム塩 (HY TBA) (二糖単位を基準にして  $1 \times 10^{-3}$  モル) を、窒素ガス下で攪拌しながら、30 ml の DMF 中に溶解した。2 ml の DMF 中に溶解した 0.15 g のヨウ化クロロメチルピリジリウム (CMPJ) ( $6 \times 10^{-4}$  モル) を、0℃に保ちながら、前記溶液に一滴ずつ加えた。このモル比 HY TBA : CMPJ は 2 : 1 であった。20 分後に、前記溶液に 2 ml の 1, 3-ジアミノプロパン (0.024 モル) を加えた。

。その後0.5mlのトリエチルアミンを加えた。固体のゼリー様の産物が得られ、そしてこれをDMFで完全に洗浄した。

DMFを蒸発した後、この産物を水中で膨潤させ、エタノールで洗浄し、そして凍結乾燥した。

【0043】

得られた産物は、架橋度0.5を有し、そして走査顕微鏡では大きなメッシュが間に入り込んだ粒状の外観を示した。より高倍率では、この2つの形態は明らかに同一であり、直径数ミクロンの丸型の隆起物を示した。

IR (フィルム) :  $1740\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{COOH}$ ) ;  $1630\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CO}-\text{NH}-$ ) ;  $1610\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{COO}^-$ ) ;  $1560\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CO}-\text{NH}-$ )。

このゲルをPBS中で膨潤させ、そして最大膨潤能を評価した。SD = 23500。

【0044】

【化1】

NMR (13C; ppm) : 29.3及び39.8 ( $-\overset{1}{\text{CH}_2}-\overset{2}{\text{CH}_2}-\overset{3}{\text{CH}_2}-$ プロパンジアミン  
 連結) ; 172.5 ( $-\overset{\cdot}{\underset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ )。

$23 \pm 0.1^\circ\text{C}$ の温度で、Bohlin VORレオメーターで評価したレオロジー特性から、動的弾性率 $G'$  (10Hzで100Pa)は、考慮した2つの濃度 (10及び20mg/ml)で同一であり、そして常に動的粘性率 $G''$  (20mgで10Hzで40Pa、及び10mgで10Hzで20Pa)よりも高いことが示された。

【0045】

#### 実施例6～9

上記実施例に記載した方法に従って、表1に要約した特徴を有する架橋ヒアルロン酸誘導体を、 $1 \times 10^{-3}$ モル (0.6g)のヒアルロン酸トリブチルアンモニウム塩から調製した。得られた誘導体は下記の特徴を有する。

【0046】



【表1】

表 1

実施例	架橋剤 (モル)	CMPJ量g (モル)	架橋度	SD	NMR (13) (ppm)	I. R. (711μ) (cm <sup>-1</sup> )	走査顕微鏡 による外観
6	1,3-ジブタンジアミン (0.024)	0.6g (1.210 <sup>-3</sup> )	(100%)	13200	29.3/39.8 (-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -ブ ンジ7ミ/連結); . 172.5 (-C(=O)-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -)	1630 (-CO-NH-); 1560 (-CO-NH-);	均質で、液状の 形態。
7	0,0'-ビ ス-(2-ジ7ミ /ブビル) PEG500 (0.022)	0.15g (6×10 <sup>-4</sup> )	(50%)	9000			滑らかな領域と マッシュ状とが交互 にあり、サイズ数 ミクロンの円形隆起 がある。
8	0,0'-ビ ス-(2-7ミ/ブ ビル)-PEG 800 (0.022)	0.15g (6×10 <sup>-4</sup> )	(50%)	6100			形態的に異なる 2つの領域があ り、1つは波状 のものであり、 もう1つは穴様 構造である。
9	1,6-ジ7ミ/ キサン (0.023)	0.15g (6×10 <sup>-4</sup> )	(50%)	8000	169.46 (架橋の-CO-NH-); 74.04/76.80/83.17/80.41 (架橋7-μの-CH <sub>2</sub> -)	1740 (-COOH); 1630 (-CO-NH-); 1610 (-COO <sup>-</sup> ); 1560 (-CO-NH-);	滑らかな表面、 サイズ数ミクロンの隆 起部あり。

【0047】

実施例10

50%架橋されたヒアルロン酸(HY)の硫酸化。

実施例5で得られた誘導体を、窒素ガス下で強く攪拌しながら、5mlのDMF中に分散する。

1モルDMF中の1gのSO<sub>3</sub>/ピリジン溶液を0℃で加え、3時間攪拌した。過剰のH<sub>2</sub>O(50ml)を加えることにより、反応を阻害し、そしてそのpHを0.1M NaOHで9に調整した。

この産物をエタノール及び水で完全に洗浄し、そして凍結乾燥した。

【0048】

IRスペクトルでは、開始産物のバンドの他に、1260cm<sup>-1</sup>に1つのピークが、そして1025cm<sup>-1</sup>に1つのより強いバンドが示された。

PBS中での当該ゲルの膨潤では、SD=33000であった。より高分解な<sup>13</sup>C-NMRスペクトルでは、37℃、水中で、表2に示した通りのシグナルが示された。29.3及び38.8ppm(-CH<sub>2</sub>-)でのNMRシグナル強度及び172.5ppm(CONH)でのシグナル強度から、架橋度が約50%であることが確認された。

【0049】

このレオロジー特性は、動的弾性率G' (10Hzにて20mgで2500Pa、そして10mgで1000Pa)により特徴づけられ、これは、常に動的粘性率G'' (10Hzにて20mgで600Pa、そして10mgで150Pa)よりも高く、そして非硫酸化HYにおいて得られた対応する値(50%で13、実施例5)よりも非常に高い。この化合物のトロンビン時間(TT)(61±5")は、コントロール(14.0")及び対応非架橋体(14.6")よりも長い。

ストレスを与えたウサギを用いたPRPテストでも、当化合物は活性を示した。

【0050】

【表2】

表 2  
<sup>13</sup>C化学シフトの表

C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	x-C=O	y-CH <sub>3</sub>	
103.5	57.3	85.4	71.3	78.7	178.0	25.3	ppm
C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	6-C=O		
105.9	75.2	76.4	82.8	78.6	176.2		ppm
1-CH2	2-CH2	3-CH2	6'-C=O	架橋			
39.8	29.3	39.8	172.5				ppm

[ 0 0 5 1 ]

実施例 1 1

同じ方法により、実施例 7, 8 及び 9 に記載の 5 0 % 架橋産物の硫酸化誘導体

を合成した。

表3で、これらの硫酸化誘導体の熱量測定における特徴を、実施例5及び10に記載の産物の特徴と共に示す。

[ 0 0 5 2 ]

【表3】

架橋ポリマー (50%架橋度)	$\Delta H_a$ [J/g]	$T_g$ [°C]	$\Delta H_b$ [J/g]	Wt% 水
C. L. Hyal-1, 3 (実施例5)	276	51	42	12
C. L. HyalS-1, 3 (実施例10)	357	64	53	16
C. L. Hyal-1, 6 (実施例9)	327	64	58	16
C. L. HyalS-1, 6	465	64	65	20
5 C. L. Hyal-P500. 2NH <sub>2</sub> (実施例7)	239	45	72	10
6 C. L. HyalS-P500. 2NH <sub>2</sub>	384	69	113	16
7 C. L. Hyal-P800. 2NH <sub>2</sub> (実施例8)	179	73	30	10
8 C. L. HyalS-P800. 2NH <sub>2</sub>	206	76	52	10
Hyal ITBA	164	—	130	5

$\Delta H_a$  [J/g] : 水蒸気化エンタルピー

$T_g$  [°C] : ガラス転移温度

$\Delta H_b$  [J/g] : 熱崩壊過程におけるエンタルピー

Wt% 水 :  $\Delta H_a$ に基づく水含有率%

[ 0 0 5 3 ]

実施例12

Cu, Zn及びFeの錯体の調製。

実施例5に記載の凍結乾燥したゲル100mgを、室温で攪拌しながら、蒸留水中の塩化銅(II)の濃溶液200mlに加えた。この懸濁液を24時間攪拌し、そしてエタノール添加により錯体を沈殿させた。遠心後、過剰のイオンを除くために、その残査を水及びエタノールでくりかえし洗浄した。

【0054】

青緑色の最終ゲルを凍結乾燥し、そして分析した。同じ方法を、ZnCl<sub>2</sub>及びFeCl<sub>3</sub>を用いて行った。分析(EDAX、ポーラログラフィー、HCl 0.1Nによる滴定、原子吸光)により、二糖単位あたり0.5モルの銅含有量が示された。

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ターマコード (参考)
A 6 1 P 19/00		A 6 1 P 19/00	
27/02		27/02	
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW ), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, C R, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, K Z, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, S K, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW			
Fターム(参考)	4C081 AB21 AB31 BB01 BB07 CD081		
	DA15		
	4C086 AA02 AA03 EA25 MA01 MA04		
	NA14 ZA33 ZA96		
	4C090 AA02 AA09 BA67 BB18 BB22		
	BB35 BB53 BB62 BB98 DA09		
	DA10 DA23 DA24		